

résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment.

b) introduction du gène *yueD* codant Benzyl réductase de *Bacillus cereus* dans la souche $\Delta(pgi, udhA)$ ou également $\Delta(pfkA, pfkB, udhA)$

5 Le gène *yueD* de *Bacillus cereus* est cloné dans le vecteur pTrC99A (Amersham-Pharmacia). Les oligonucléotides YueDR et YueDF sont utilisés pour amplifier le gène à partir de l'ADN génomique de *Bacillus cereus*.

YueDR (SEQ ID NO 41): CGTGAATTCttattcatcaattctaataa
avec

10 une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (731 à 750) de gène *yueD* (séquence de référence sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

une région (caractères majuscules) pour permettre la coupure avec l'enzyme *EcoRI*.

YueDF (SEQ ID NO 42): ACGTTCatgAgAtacgttatcataacaggaac

15 avec

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence de *yueD* (1 à 26) du gène *yueD*.

une région (bases changées et ajoutées, caractères majuscules) pour permettre la coupure avec l'enzyme *BspHI*

20 Le produit PCR obtenu est alors digéré avec les enzymes des restriction *BspHI* et *EcoRI* et cloné dans le vecteur pTrC99A préalablement digéré avec *NcoI* et *EcoRI*. Le plasmide obtenu, nommé pYU1, est donc introduit par électroporation dans la souche MG1655 $\Delta(pgi, udhA)$. Le gène *yueD* code pour une benzil réductase NADPH-dépendente qui réduit efficacement le 1-phenyl-1,2-propanedione (k_{cat} 165
25 min^{-1} ; K_m : 42 μM) mais présente une plus faible activité pour le p-nitrobenzaldehyde (k_{cat} 1.2 min^{-1} ; K_m : 261 μM) (Maruyama, R. Nishizawa, M.; Itoi, Y.; Ito, S.; Inoue, M. (2002) The enzyme with benzil reductase activity conserved from bacteria to mammals. *J. Biotechnology* 94 : 157-169).

c) culture et évolution de la souche modifiée sur un milieu minimum

30 Le taux de croissance maximal de la souche obtenue *E. coli* [$\Delta(udhA, pgi)$ *yueD*] est évalué sur milieu minimum (μ_{max} = 0.04). Dans ces conditions, il est très inférieur à celui de la souche non modifiée (μ_{max} = 0.61). On décide alors d'ajouter